

بررسی خصوصیات شیمیایی، ویژگی‌های عملکردی و فعالیت ضد رادیکالی پلی‌ساکاریدهای محلول در آب غلاف نخود فرنگی

الهام لطفی^۱، علی گنجلو^{۲*}، میرخلیل پیروزی فرد^۳، ماندانا بی‌مکر^۲

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آفاق، ارومیه، ایران

۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۳- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۴/۱۷)

چکیده

هدف این پژوهش به دلیل نقش پلی‌ساکاریدها به عنوان مولکول‌های بزرگ زیستی در مهار رادیکال‌های آزاد، بررسی خصوصیات شیمیایی، ویژگی‌های عملکردی و ضد رادیکالی پلی‌ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی به عنوان یکی از ضایعات فراوان و ارزان قیمت کارخانجات فراوری مواد غذایی است. پلی‌ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی طی فرایندهای چربی زدایی، حذف ترکیبات با وزن مولکولی کم، استخراج آبی، پروتئین زدایی، رسوب با اتانول و شستشو با اتانول و استون خالص استخراج شدند. آنالیز ساختاری به روش طیفسنجی تبدیل فوریه مادون قرمز انجام شد که در طیف تبدیل فوریه مادون قرمز باندهای شاخص پلی‌ساکاریدها مشاهده گردید. ترکیب مونوساکاریدی شامل گلوکز، گالاکتوز، رامنوز، مانوز، گزیلوز و آرابینوز بود. خصوصیات عملکردی نظیر ظرفیت نگهداری آب و ظرفیت جذب روغن به ترتیب معادل $2/25 \pm 0/12$ و $3/95 \pm 0/98$ اندازه گیری شد. ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایدارکنندگی امولسیون پلی‌ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی در غلظت ۶ درصد وزنی - حجمی بیش از ۷۵ درصد بود. فعالیت ضد رادیکالی پلی‌ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی بر اساس آزمون‌های ۱،۱ دی فنیل - ۲-پیکریل هیدرازیل (DPPH) و هیدروژن پراکسید (H_2O_2) چشمگیر بود. به طور کلی غلاف نخود فرنگی را می‌توان به عنوان یک منبع طبیعی و ارزان قیمت برای استخراج فراورده‌های با ارزش افزوده بالا نظیر پلی‌ساکاریدها معرفی نمود که علاوه بر استفاده‌های تکنولوژیکی از آن می‌توان به عنوان یک عامل ضد رادیکال طبیعی نوین در جهت تولید مواد غذایی فراسودمند استفاده نمود.

کلید واژگان: استخراج با آب داغ، پلی‌ساکاریدها، غلاف نخود فرنگی، فعالیت ضد رادیکالی.

* مسئول مکاتبات: aganjloo@znu.ac.ir

۱- مقدمه

پلی‌ساکاریدها از جمله مولکول‌های بزرگ زیستی ضروری هستند که از بهم پیوستن مونوساکاریدها از طریق پیوندهای گلیکوزیدی تشکیل می‌شوند و به‌طور گسترده در منابع گوناگون نظیر محصولات کشاورزی، میکروارگانیسم‌ها، منابع دریایی، مایعات بدن حیوانات و پوسته سخت پوستان یافت می‌شوند [۱]. به‌طور کلی بسیاری از پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از منابع گیاهی از فعالیت ضد رادیکالی قوی برخوردار هستند و در نتیجه می‌توانند نقش مهمی در رژیم غذایی جهت مهار رادیکال‌های آزاد برای پیشگیری از آسیب‌های اکسیداتیو ایفا می‌کنند [۴]. معمولاً فعالیت ضد رادیکالی پلی‌ساکاریدها با شکستن واکنش‌های زنجیره اکسایش از طریق اهدا اتم هیدروژن همراه است. همچنین خواص احیا کنندگی پلی‌ساکاریدها به دلیل وجود رادیکال‌ها است که از طریق واکنش با پیش‌سازهای پراکسید، از تشکیل پراکسیدها جلوگیری می‌کنند [۳ و ۴]. علاوه بر فعالیت‌های ضد رادیکالی و احیا کنندگی، بسیاری از پلی‌ساکاریدهای جدا شده از منابع طبیعی فعالیت‌های امولسیون کنندگی، پایدار کنندگی، ضد توموری و ضد التهابی نیز از خود نشان داده‌اند [۵-۷]. با توجه به اثرات نامطلوب استفاده از ترکیبات ضد اکسایش مصنوعی نظیر بوتیلید هیدروکسی آنیزول و بوتیلید هیدروکسی تولوئن بر سلامت انسان‌ها و از طرفی ویژگی‌های تکنولوژیکی و فراسودمند مطلوب پلی‌ساکاریدها، مطالعات در راستای یافتن منابع جدید به‌منظور بهره برداری از چنین بسپارهای زیستی طبیعی مورد توجه قرار گرفته است.

مهم‌ترین و متداول‌ترین روش استخراج برای به‌دست آوردن پلی‌ساکاریدها استفاده از آب داغ است. چندین پارامتر از جمله زمان استخراج، دمای استخراج، نسبت آب به مواد جامد و دفعات استخراج این فرایند را تحت تاثیر قرار می‌دهند که با به‌کارگیری متناسب این پارامترها می‌توان به حداکثر کمیت و کیفیت دست یافت [۷].

وحید سماواتی و همکاران (۲۰۱۳) به مطالعه فرایند استخراج پلی‌ساکاریدها از پنیرک صحرائی توسط آب داغ و بررسی فعالیت ضد رادیکالی آن پرداختند. بر اساس نتایج به‌دست آمده مناسب‌ترین شرایط برای دستیابی به حداکثر بازده کمی استفاده از دمای ۹۰ درجه سلسیوس، زمان ۴ ساعت، ۲ تکرار و نسبت آب به مواد جامد ۱:۲۱ به‌دست آمد. نتایج بیانگر توانایی بالای

پلی‌ساکاریدهای پنیرک صحرائی برای مهار رادیکال‌های آزاد ۲ و ۱- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) و رادیکال‌های هیدروکسیل در شرایط آزمایشگاهی نیز بود [۸]. تدینی و همکاران (۱۳۹۳) به بررسی برخی از خصوصیات فراسودمند پلی‌ساکارید استخراج شده از هسته خرما پرداختند. نتایج نشان داد که پلی‌ساکاریدهای جدا شده از هسته خرما قادر به مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در حدود ۴۰ درصد بوده که از این لحاظ نسبت به اینولین برتری دارد. همچنین در این مطالعه مشخص شد که با افزایش غلظت پلی‌ساکاریدها فعالیت ضد رادیکالی نیز افزایش می‌یابد (۹). از طرفی نتایج پژوهش از تورک و همکاران (۲۰۱۶) نشان می‌دهد که برخی از پلی‌ساکاریدهای طبیعی از طریق اتصال زنجیره‌های کربوهیدراتی آب‌دوست خود به گروه‌های غیر قطبی مانند گروه آمینی پروتئین‌ها، خواص امولسیون کنندگی خوبی از خود نشان می‌دهند [۱۰].

طبق گزارش سازمان غذا و کشاورزی سازمان ملل متحد سطح زیر کشت نخود فرنگی در جهان در سال ۲۰۱۳ بالغ بر ۶/۳۸ میلیون هکتار با تولید دانه به مقدار ۱۸/۵ میلیون تن بوده است. از آنجایی که در سراسر جهان نخود فرنگی پس از غلاف گیری به بازار عرضه شده و مورد مصرف قرار می‌گیرد، در نتیجه دفع مواد زائد تولید شده پس از فراوری آن یک مشکل مهم در صنعت به‌شمار می‌آید. مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد این محصول کشاورزی و محصولات جانبی آن منبع مهمی از فیبرهای خوراکی و ترکیبات زیست فعال هستند که می‌توانند خواص تکنولوژیکی و یا تغذیه‌ای را بهبود بخشند [۱۱-۱۳].

در نهایت، هدف از انجام این پژوهش بررسی خصوصیات اولیه شیمیایی، عملکردی و ضد رادیکالی پلی‌ساکاریدهای محلول در آب غلاف نخود فرنگی به‌عنوان یکی از ضایعات فراوان و ارزان قیمت کارخانجات فراوری مواد غذایی می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

غلاف‌های نخود فرنگی از استان زنجان در تابستان ۱۳۹۴ تهیه شد. تمام مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده در این مطالعه از شرکت سیگما-آلدریج ایالات متحده آمریکا خریداری شدند.

۲-۲- آماده سازی نمونه

در ابتدا غلاف‌های نخود فرنگی شسته شد و در سایه و دمای اتاق تا رسیدن به رطوبت $8/5 \pm 0/2$ درصد خشک شدند. غلاف‌های خشک شده نخود فرنگی تا رسیدن به مش ۳۰ آسیاب شدند. فرآیند چربی‌زدایی در دستگاه سوکسله با استفاده از هگزان نرمال به مدت ۶ ساعت صورت پذیرفت. برای حذف رنگ، برخی از قندهای آزاد، اسیدهای آمینه و برخی فنول‌ها، از اتانول ۹۵٪ با دمای ۷۰ درجه سلسیوس و نسبت یک گرم نمونه به ۲۰ میلی‌لیتر حلال استفاده شد. غلاف‌های نخود فرنگی پس از جدا شدن اتانول توسط کاغذ صافی در آون با دمای ۴۰ درجه سلسیوس خشک شدند. فرآیند خشک کردن تا رسیدن به وزن ثابت ادامه یافت [۸]. نمونه‌ها درون ظروف تیره رنگ در بسته در دمای ۱۸- درجه سلسیوس قبل از انجام استخراج نگهداری شدند.

۲-۳- استخراج پلی‌ساکاریدها با استفاده از

آب داغ

براساس نتایج مطالعات اولیه، پلی‌ساکاریدهای محلول در آب از غلاف نخود فرنگی با استفاده از حمام آب با دمای ۹۰ درجه سلسیوس و با رعایت نسبت یک گرم نمونه به ۲۰ میلی‌لیتر حلال طی مدت زمان ۳ ساعت استخراج شدند. عصاره به‌دست آمده پس از عبور از کاغذ صافی (واتمن شماره ۱) به‌منظور جداسازی ترکیبات نامحلول در ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۲۵ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید. محلول رویی به‌دست آمده از سانتریفیوژ توسط دستگاه تبخیر کننده چرخشی تحت خلاء در دمای ۶۰ درجه سلسیوس تا رسیدن به ۱۰٪ حجم اولیه تغلیظ شد. پروتئین زدایی به روش *Sevag* و با استفاده از معرف *Sevag* (۱- بوتانول: کلروفرم با نسبت ۱:۴) انجام گرفت (۱۴). سپس ۴ برابر حجم عصاره تغلیظ شده اتانول ۹۵ درصد اضافه شد و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری گردید. در نهایت برای به‌دست آوردن پلی‌ساکاریدهای خام از نیروی گریز از مرکز (۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه) استفاده شد و ترکیب رسوب کرده سه بار با استون و اتانول خالص شسته شد و در دمای ۴۰ درجه سلسیوس تا زمان رسیدن به وزن ثابت خشک گردید [۱۲].

۲-۴- تعیین خصوصیات اولیه شیمیایی

پلی‌ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی

۲-۴-۱- روش‌های عمومی

میزان قند کل به روش فنل- سولفوریک اسید با استفاده از گلوکز به عنوان استاندارد تعیین گردید [۱۵]. وجود قند احیا کننده به روش فهلینگ مورد بررسی قرار گرفت [۱۶]. میزان فنول کل به روش رنگ سنجی فولین- سیکالتیو مورد بررسی قرار گرفت [۱۷] و بر حسب میلی‌گرم معادل گالیک اسید به ازاء ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه بیان شد.

۲-۴-۲- طیف سنجی فرابنفش- مرئی و تبدیل فوریه

مادون قرمز (FTIR)

طیف فرابنفش برای اطمینان از عدم وجود پروتئین در نمونه پلی‌ساکاریدی با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در دامنه ۴۰۰-۲۰۰ نانومتر در دمای ۲۵ درجه سلسیوس توسط دستگاه طیف سنج نوری فرا بنفش- مرئی (Specord 250, Analytikjena, Germany) به دست آمد. وجود پیک در محدوده طول موج ۲۸۰-۲۵۰ نانومتر نشانگر وجود پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک در نمونه پلی‌ساکاریدی است [۱۸].

از روش طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز برای شناسایی گروه‌های عاملی استفاده می‌شود. برای این منظور ۱ میلی‌گرم از پلی‌ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی با ۲۰۰ میلی‌گرم پودر پتاسیم برماید مخلوط و به‌صورت قرص با ضخامت ۱ میلی‌متر فشرده شد. طیف مادون قرمز توسط دستگاه طیف سنج تبدیل فوریه مادون قرمز در محدوده فرکانس $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ به‌دست آمد [۱۹].

۲-۴-۳- آنالیز مونوساکاریدها

آنالیز مونوساکاریدها توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی - طیف سنج جرمی صورت پذیرفت. ۵۰ میلی‌گرم نمونه پلی‌ساکاریدی را در ۵ میلی‌لیتر سولفوریک اسید (۱ مولار) حل کرده و آن را به مدت ۶ ساعت در آون با دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار می‌دهیم. پس از حذف سولفوریک اسید باقیمانده توسط اتانول و دستگاه تبخیر کننده چرخان تحت خلاء، ترکیب آب‌کافت شده در ۰/۵ میلی‌لیتر پیریدین و ۱۰ میلی‌گرم هیدروگزیکلامین هیدروکلراید مخلوط شد و ۳۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از آن‌که

میلی‌لیتر محلول پلی‌ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی در آب مقطر با غلظت‌های مختلف (۱، ۲، ۴ و ۶٪) تهیه شد و سپس به آن ۳ میلی‌لیتر روغن آفتابگردان اضافه شد. مخلوط آب و روغن با استفاده از امواج فراصوت همگن شد و در نهایت مخلوط به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰g سانتریفوژ گردید.

ظرفیت امولسیون‌کنندگی بر اساس رابطه ۳ محاسبه شد.

$$100 \times \text{ارتفاع کل} / \text{ارتفاع لایه امولسیون} = \text{ظرفیت امولسیون}$$

کنندگی

توانایی پایدار کنندگی امولسیون پلی‌ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی از طریق حرارت دهی امولسیون در ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه و خنک کردن آن به وسیله آب به مدت ۱۵ دقیقه و سانتریفوژ کردن امولسیون با دور ۱۳۰۰g به مدت ۵ دقیقه ارزیابی می‌شود. پایداری امولسیون از طریق رابطه ۴ تعیین شد.

$$100 \times \text{ارتفاع کل} / \text{ارتفاع لایه امولسیون باقیمانده} = \text{توانایی}$$

پایدار کنندگی امولسیون

۲-۶- تعیین فعالیت ضد رادیکالی

پلی‌ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی

۲-۶-۱- تعیین فعالیت ضد رادیکالی به روش دی فنیل

پیکریل هیدرازیل (DPPH)

در این آزمون توانایی ترکیبات پلی‌ساکاریدی برای اهدا اتم هیدروژن یا الکترون بر اساس میزان بی‌رنگ شدن محلول بنفش رنگ دی فنیل پیکریل هیدرازیل در اتانول مورد سنجش قرار گرفت. بدین منظور محلول ۰/۴ میلی‌مولار DPPH با استفاده از اتانول ۹۵ درصد تهیه شد. ۳ میلی‌لیتر از نمونه با غلظت‌های ۰/۱-۰/۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با ۱ میلی‌لیتر از محلول DPPH مخلوط گردید. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در محیط تاریک قرار گرفت و سپس میزان جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه طیف سنج نوری فرا بنفش- مرئی اندازه‌گیری شد. از آسکوربیک اسید به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید [۲۴]. درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH توسط پلی‌ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی از طریق رابطه ۵ محاسبه گردید.

$$\text{درصد مهار رادیکال آزاد DPPH} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

ترکیب سرد شد، ۰/۵ میلی‌لیتر استیک آنهیدرید به آن اضافه گردید و دوباره به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس ترکیب آلدیتول استات توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی - طیف سنج جرمی مجهز به ستون HP-5 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت [۲۰].

۲-۵- خصوصیات عملکردی

۲-۵-۱- ظرفیت نگهداری آب

ظرفیت نگهداری آب به روش روبرتسون و همکاران (۲۰۰۰) اندازه‌گیری شد (۲۱). ۳ گرم از پلی‌ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی (W_p) درون یک لوله فالکون توزین گردید. ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن افزوده شد و مخلوط به مدت ۱۸ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. سپس محلول پلی‌ساکاریدی به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۹۳۰۰g سانتریفوژ شد. در نهایت فاز رویی خارج گردید و به‌منظور به‌دست آوردن باقیمانده تازه W_{fr} لوله فالکون به مدت ۳ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. ظرفیت نگهداری آب با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید.

$$[(W_{fr} - W_p) / W_p] = \text{ظرفیت نگهداری آب (گرم آب/گرم پلی‌ساکارید)}$$

پلی‌ساکارید

۲-۵-۲- ظرفیت جذب روغن

برای اندازه‌گیری ظرفیت جذب روغن ۰/۵ گرم از پلی‌ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی در لوله فالکون قرار گرفت (W_p) و توزین گردید. ۱۰ میلی‌لیتر روغن آفتابگردان به آن افزوده شد. محلول پلی‌ساکاریدی طی ۳۰ دقیقه هر ۵ دقیقه به مدت ۳۰ ثانیه هم‌زده شد. سپس محلول پلی‌ساکاریدی به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۶۰۰g سانتریفوژ گردید. فاز رویی خارج شد و لوله سانتریفوژ توسط دستمال کاغذی خشک گردید و در نهایت دوباره توزین شد (W_a). ظرفیت جذب روغن از طریق رابطه ۲ محاسبه شد (۲۲).

$$[(W_a - W_p) / W_p] = \text{ظرفیت جذب روغن (گرم روغن/گرم پلی‌ساکارید)}$$

پلی‌ساکارید

۲-۵-۳- خصوصیات امولسیون‌کنندگی

ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایدار کنندگی امولسیون پلی‌ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی بر اساس روش یاسوماتسو و همکاران (۱۹۷۲) مورد ارزیابی قرار گرفت [۲۳]. ۱۰

کربوهیدرات کل در نمونه $1/81 \pm 89/58$ درصد بود که نشانگر مقدار بالای کربوهیدرات در نمونه به دست آمده می‌باشد. این مقدار مشابه مقدار کربوهیدرات گزارش شده برای پوست سیب زمینی است [۲۶]. به منظور بررسی وجود قندهای احیا کننده در نمونه از آزمون فهلینگ استفاده گردید. نتیجه این آزمون برای پلی‌ساکاریدهای محلول در آب استخراج شده از غلاف نخود فرنگی منفی بود. این نتیجه بیانگر آنست که پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از غلاف نخود فرنگی فاقد قندهای احیا کننده می‌باشند. مقدار ترکیبات فنولی کل معادل $1/09 \pm 58/09$ میلی‌گرم معادل گالیک اسید به ازاء ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه به دست آمد که نشان می‌دهد فعالیت ضد رادیکالی پلی‌ساکاریدهای محلول در آب غلاف نخود فرنگی تحت تاثیر ترکیبات فنولی نیست.

در طیف فرابنفش، حداکثر پیک جذب در محدوده ۲۰۰ نانومتر مشاهده گردید که مربوط به پلی‌ساکاریدها است و پیک‌های ضعیف در محدوده طول موج ۲۸۰-۲۵۰ نانومتر مشاهده گردید که نشانگر وجود مقدار بسیار ناچیز پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک در نمونه و در نتیجه خلوص بالای پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از غلاف نخود فرنگی می‌باشد. از طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز معمولاً برای بررسی نوع پیوندهای گلیکوزیدی و گروه‌های عاملی در ساختار پلی‌ساکاریدها استفاده می‌شود [۲۷]. طیف مادون قرمز پلی‌ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی در شکل ۱ نشان داده شده است. وجود باند در محدوده 750 cm^{-1} نشان‌دهنده حضور دی-گزیلوز است. همچنین مشاهده باند در محدوده 800 cm^{-1} تایید کننده حضور مانوز در ترکیب پلی‌ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی است. باندهای مشاهده شده در دامنه $1200-850 \text{ cm}^{-1}$ پیک‌های مشخصه پلی‌ساکاریدها است که ناشی از ارتعاشات کششی مربوط به گروه‌های C-O-H و C-O-C می‌باشند که مشخصه وجود حلقه پیرانوزی در ساختار پلی‌ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی است (۲۸ و ۲۴). باندهای مشاهده شده در 835 cm^{-1} و 911 cm^{-1} وجود پیوندهای آلفا و بتا در فرم پیرانوزی قندها در ساختار پلی‌ساکارید استخراج شده از غلاف نخود فرنگی را تایید می‌کنند. وجود باند در 1242 cm^{-1} نشانگر اتصالات S=O با ارتعاشات کششی است که شاخص حضور سولفات در ساختار پلی‌ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی است [۲۹]. وجود

در این رابطه A_0 میزان جذب محلول DPPH بدون اضافه کردن نمونه؛ A_1 میزان جذب پلی‌ساکارید به همراه محلول DPPH و A_2 میزان جذب نمونه بدون محلول DPPH است.

۲-۶-۲- تعیین فعالیت ضد رادیکالی به روش

هیدروژن پراکسید (H_2O_2)

توانایی به دام انداختن هیدروژن پراکسید توسط پلی‌ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی طبق روش جیانگ و همکاران (۲۰۱۴) با اندکی تغییرات مورد بررسی قرار گرفت (۲۵). محلول پراکسید هیدروژن (۴۰ میلی‌مولار) در بافر فسفات (۵۰ میلی‌مولار، pH معادل ۷/۴) تهیه شد. ۱ میلی‌لیتر محلول پلی‌ساکاریدی با غلظت‌های ۰/۱-۰/۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هیدروژن پراکسید اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه میزان جذب در طول موج ۲۳۰ نانومتر خوانده شد. درصد به دام انداختن هیدروژن پراکسید با استفاده از رابطه ۶ به دست آمد.

$$\text{درصد به دام انداختن هیدروژن پراکسید} = \frac{(A_0 - A_1 + A_2)}{A_0} \times 100$$

در این رابطه A_0 میزان جذب نمونه کنترل (آب مقطر به جای نمونه)؛ A_1 میزان جذب نمونه حاوی پلی‌ساکارید و محلول هیدروژن پراکسید و A_2 میزان جذب نمونه (اضافه شدن آب مقطر به جای محلول هیدروژن پراکسید) است.

۲-۷ تجزیه و تحلیل داده‌ها

این مطالعه در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۹۵ درصد توسط نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار اکسل نسخه ۲۰۱۳ استفاده شد. تمام آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شدند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تعیین خصوصیات اولیه شیمیایی

پلی‌ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی

خصوصیات اولیه شیمیایی پلی‌ساکاریدهای استخراج شده در دمای ۹۰ درجه سلسیوس، نسبت یک گرم نمونه به ۲۰ میلی‌لیتر حلال و زمان ۳ ساعت تعیین گردید. مقدار

کربن شماره ۶ واحدهای قندی و آب پیوسته است. باند مشاهده شده در محدوده 3467 cm^{-1} مربوط به گروه‌های هیدروکسیل (OH) با ارتعاشات کششی در ساختار پلی‌ساکاریدها است. این دو پیک از گروه‌های عاملی شاخص در ساختار پلی‌ساکاریدها محسوب می‌شوند [۳۲]. از آنجایی که بطور کلی باندهای شاخص پلی‌ساکاریدها در ناحیه $1000\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ و 2950 cm^{-1} دیده می‌شوند، این طیف ثابت می‌کند که پلی‌ساکاریدها ترکیب غالب در عصاره استخراج شده از غلاف نخود فرنگی در این پژوهش هستند.

باند در 1615 cm^{-1} مشخصه اتصالات C=O با ارتعاشات کششی است که نشان‌دهنده حضور گروه‌های کربوکسیل نامتقارن است که می‌تواند نشان‌دهنده حضور گالاکترونیک اسید باشد (۲۹ و ۳۰). مشاهده باند در 1732 cm^{-1} نشانگر باندهای COO^- گروه استیل و کربوکسیلیک اسید استری است که شاخص حضور اورونیک اسید در ساختار پلی‌ساکاریدها می‌باشد به علاوه نشان‌دهنده طبیعت اسیدی پلی‌ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی نیز می‌باشد [۳۱]. وجود باند در 2951 cm^{-1} مربوط به اتصالات C-H با ارتعاشات کششی شامل CH، CH₂ و CH₃ در

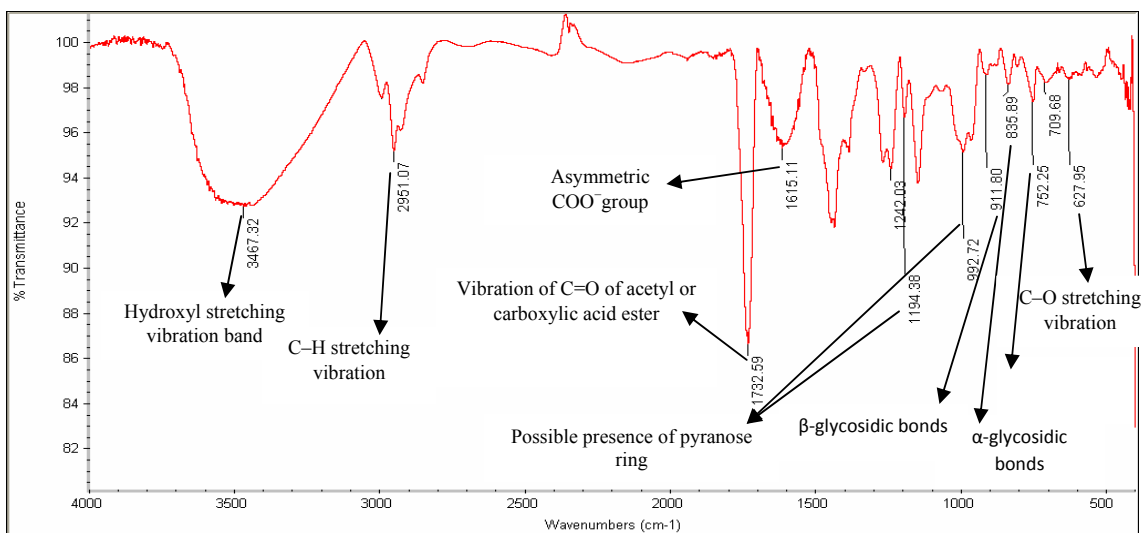


Fig 1 FTIR spectrum of water soluble green pea pod polysaccharides at optimum conditions.

آنجایی که منجر به افزایش گرانبوری، پایداری بافت و جلوگیری از پس دادن آب می‌گردد از لحاظ تکنولوژیکی از اهمیت بالایی برخوردار است.

ظرفیت جذب روغن به توانایی سطحی پلی‌ساکاریدی برای جذب ترکیبات آلی بر می‌گردد که استفاده از چنین ترکیباتی برای پایداری بافت امولسیون‌های دارای مقادیر بالای روغن از اهمیت بالایی برخوردار است. در این مطالعه ظرفیت جذب آب پلی‌ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی $2/25 \pm 0/12$ گرم آب به ازاء گرم نمونه بدست آمد. این مقدار بیشتر از ظرفیت جذب آب پلی‌ساکاریدهای پسته و بادام (حداکثر $1/97$ گرم آب به ازاء گرم نمونه) می‌باشد [۴].

در این مطالعه مقدار جذب روغن توسط پلی‌ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی معادل $3/95 \pm 0/98$ گرم روغن به ازاء گرم نمونه به دست آمد. این مقدار بیشتر از قابلیت جذب روغن

۳-۲- آنالیز مونوساکاریدها

ترکیب مونوساکاریدهای موجود در ساختار پلی‌ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی به صورت گلوکز، گالاکتوز، رامنوز، مانوز، گزیلوز و آرابینوز به ترتیب با نسبت‌های ۱۲٪، ۱۰/۵۹٪، ۶٪، ۴٪، ۲۰/۵٪، ۳۰/۸٪ بود. نتیجه به دست آمده بیانگر آنست که گالاکتوز، مونوساکارید غالب در پلی‌ساکاریدهای محلول در آب غلاف نخود فرنگی می‌باشد.

۳-۳- بررسی خصوصیات عملکردی

پلی‌ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی

ظرفیت نگهداری آب و جذب روغن از مهم‌ترین ویژگی‌های عملکردی در صنعت فرآوری مواد غذایی هستند. معمولاً پلی‌ساکاریدها به علت توانایی ایجاد شبکه پلی‌ساکاریدی توانایی جذب حفظ آب مطلوبی دارند. این موضوع از

۳-۴- بررسی فعالیت ضد رادیکالی

پلی ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی

اکسایش نقش مهمی در تغییر کیفیت مواد غذایی و ایجاد استرس اکسایشی و در نتیجه بروز برخی بیماری‌های خاص از طریق پراکسیداسیون چربی‌ها و تشکیل رادیکال‌های آزاد در سلول‌های زنده و محصولات غذایی ایفا می‌کند. بنابراین مهار رادیکال‌های آزاد برای محافظت از سیستم‌های زنده از طریق افزودن ضد اکسایندها بسیار حائز اهمیت است. پلی ساکاریدها گروهی از ترکیبات ضد اکسایش امیدبخش به‌شمار می‌آیند و نتایج بسیاری از مطالعات حاکی از آنست که پلی ساکاریدها ترکیباتی موثر برای مهار رادیکال‌های آزاد هستند. فعالیت ضد رادیکالی پلی ساکاریدها می‌تواند تحت تاثیر عوامل مختلفی از جمله ترکیب شیمیایی، وزن مولکولی، ساختار شیمیایی و حتی روش خشک کردن ماده اولیه قرار گیرد [۳].

در این مطالعه فعالیت ضد رادیکالی پلی ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی بر اساس قدرت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و هیدروژن پراکسید در دامنه غلظت‌های ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ و ۰/۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با آسکوربیک اسید مورد ارزیابی قرار گرفت. روند تغییرات فعالیت ضد رادیکالی پلی ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی در هر دو روش مورد مطالعه به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) وابسته به غلظت پلی ساکارید بود. میزان فعالیت ضد رادیکالی پلی ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی بر اساس آزمون DPPH به ترتیب ۵۰/۲، ۵۳/۲، ۵۸/۱، ۶۴/۵ و ۶۹/۱ درصد (شکل ۳) و بر اساس آزمون هیدروژن پراکسید به ترتیب ۳۱/۴، ۳۶/۸، ۳۹/۱، ۴۳/۲ و ۴۹/۷ درصد به‌دست آمد (شکل ۴). بر اساس نتایج به‌دست آمده میزان فعالیت ضد رادیکالی پلی ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی در هر دو آزمون کمتر از فعالیت ضد رادیکالی آسکوربیک اسید بود. اما این میزان مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد توسط پلی ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی رضایت بخش است که این امر می‌تواند دلیلی برای استفاده کردن از آن به‌عنوان یک عامل ضد اکسایش طبیعی به‌جای عوامل ضد اکسایش مصنوعی باشد. لازم به ذکر است که تصور می‌شود فعالیت ضد رادیکالی پلی ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی با توانایی آن برای اهداء هیدروژن مرتبط باشد.

توسط پلی ساکاریدهای آرد نخود (۳/۱۵ گرم روغن به ازاء گرم نمونه) است [۳۳].

امولسیون‌ها سامانه‌های متشکل از دو مایع (معمولا آب و روغن) غیر قابل امتزاج هستند که از نظر ترمودینامیکی ناپایدار می‌باشند. این سامانه‌ها اساس بسیاری از محصولات غذایی را تشکیل می‌دهند. بسپارهای زیستی نظیر پروتئین‌ها و برخی از پلی ساکاریدها به‌عنوان امولسیون کننده و پایدار کننده‌های طبیعی برای پایداری سامانه‌های امولسیون مورد استفاده قرار گرفته‌اند. ویژگی‌های امولسیون کنندگی پلی ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی به وسیله دو پارامتر ظرفیت امولسیون کنندگی و پایداری کنندگی امولسیون مورد مطالعه قرار گرفته است (شکل ۲). نتایج حاکی از آنست که هر دو پارامتر مورد مطالعه با افزایش غلظت پلی ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی بطور معنی‌داری ($P < 0.05$) افزایش می‌یابند. به‌طوری‌که ظرفیت امولسیون کنندگی و پایداری کنندگی امولسیون در غلظت ۶٪ بیش از ۷۵ درصد به‌دست آمد. نتایج مطالعه لروکس و همکاران (۲۰۰۳) بیانگر آنست که توانایی امولسیون کنندگی پلی ساکاریدها به‌دلیل حضور مقادیر بسیار ناچیز پروتئین است که به‌طور کوالانی به ساختار پلی ساکاریدها متصل شده است [۳۴]. نتایج بررسی خصوصیات اولیه شیمیایی وجود مقادیر بسیار ناچیز پروتئین در ساختار پلی ساکاریدهای محلول در آب غلاف نخود فرنگی را تایید می‌نماید.

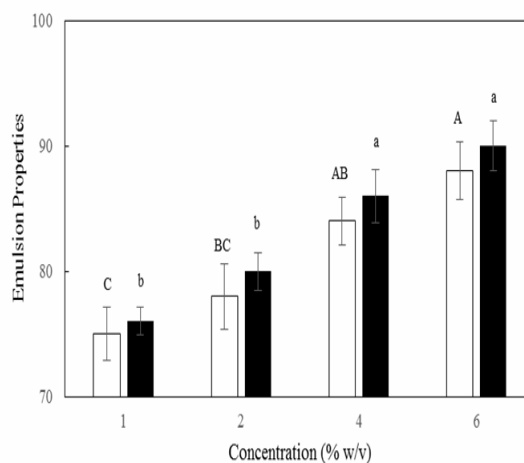


Fig 2 Emulsion properties (EC; emulsion capacity (□) and ES; emulsion stability (■)) of water soluble green pea pod polysaccharides at different concentrations. Different capital and small letters show significant differences at $P < 0.05$ for EC and ES, respectively.

خصوصاً پلی‌ساکاریدها بشمار آورد که علاوه بر کاربردهای تکنولوژیکی، از آن به‌عنوان یک عامل ضد رادیکال طبیعی نوین در جهت تولید مواد غذایی فراسودمند نیز می‌توان استفاده نمود.

۵- منابع

- [1] Zong, A., Cao, H. and Wang, F. (2012). Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. *Carbohydrate Polymers*, 90:1395-1410.
- [2] Zeng, W.-C., Zhang, Z. and Jia, L.R. (2014). Antioxidant activity and characterization of antioxidant polysaccharides from pine needle (*Cedrus deodara*). *Carbohydrate Polymers*, 108:58-64.
- [3] Fan, L., Li, J., Deng, k. and Ai, L. (2012). Effects of drying methods on the antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*, 87:1849-1854.
- [4] Sila, A., Bayar, N., Ghazala, I., Bougatef, A., Ellouz-Ghorbel, R. and Ellouz-Chaabouni, S. (2014). Water-soluble polysaccharides from agro-industrial by-products: Functional and biological properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 69:236-243.
- [5] Chidouh, A., Aouadi S. and Heyraud, A. (2014). Extraction, fraction and characterization of water-soluble polysaccharide fraction from myrtle (*Myrtus communis* L.) fruit. *Food Hydrocolloids*, 35:733-739.
- [6] Rui, L., Wei-chang, C., Wei-peng, W., Wen-yan T. and Xue-guang, Z. (2009). Optimization of extraction technology of *Astragalus* polysaccharides by response surface methodology and its effect on CD40. *Carbohydrate Polymers*, 78:784-788.
- [7] You, Q., Yin, X., Zhang, S. and Jiang, Z. (2014). Extraction, purification, and antioxidant activities of polysaccharides from *Tricholoma mongolicum* Imai. *Carbohydrate Polymers*, 99:1-10.
- [8] Samavati, V. and Manoochehrzade, A. (2013). Polysaccharide extraction from *Malva sylvestris* and its anti-oxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules* 60:427-436.

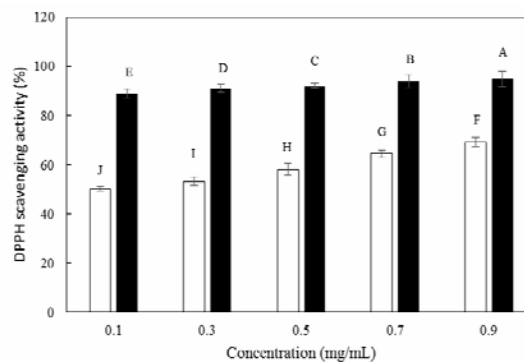


Fig 3 DPPH radical scavenging activities of ascorbic acid (■) and water soluble green pea pod polysaccharides (□) at different concentrations. Different capital letters show significant differences at $P < 0.05$.

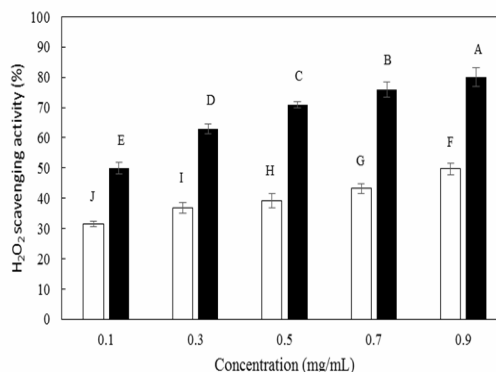


Fig 4 H₂O₂ radical scavenging activities of ascorbic acid (■) and water soluble green pea pod polysaccharides (□) at different concentrations. Different capital letters show significant differences at $P < 0.05$.

۴- نتیجه گیری

این پژوهش با هدف بررسی خصوصیات اولیه شیمیایی، عملکردی و فعالیت ضد رادیکالی پلی‌ساکاریدهای محلول در آب غلاف نخود فرنگی به‌عنوان پسماند کارخانجات صنایع تبدیلی مواد غذایی که از لحاظ اقتصادی و تغذیه‌ای ارزش کمتری برای انسان دارند، انجام شد. نتایج به‌دست آمده حاکی از آنست که پلی‌ساکاریدهای غلاف نخود فرنگی دارای ظرفیت بالای نگهداری آب و جذب روغن هستند و همچنین از آن می‌توان به‌عنوان یک پایدار کننده مناسب امولسیون با قابلیت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و هیدروژن پراکسید استفاده نمود. در نهایت غلاف نخود فرنگی را می‌توان یک منبع طبیعی و ارزان قیمت حاوی ترکیبات با ارزش افزوده بالا

- [18] Zhao, L., Dong, Y., Chen, G. and Hua, Q. (2010). Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *ganoderma lucidum*. Carbohydrate Polymers, 80: 783–789.
- [19] Chen, J., Cheng, H., Wu, D., Linhardt, R.J., Zhi, Z., Yan, L., Chen, S. and Ye, X. (2017). Green recovery of pectic polysaccharides from citrus canning processing water. Journal of Cleaner Production, 1-11.
- [20] Xu, J.-K., Li, M.-F. and Sun, R.-C. (2011). Identifying the impact of ultrasound-assisted extraction on polysaccharides and natural antioxidants from *Eucommia ulmoides* Olive. Process Biochemistry, 50: 473–481.
- [21] Robertson, J. A., De-Monredon, F. D., Dysseler, P., Guillon, F., Amado, R. and Thibault, J. F. (2000). Hydration properties of dietary fiber and resistant starch: A European collaborative study. Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie, 33: 72-79.
- [22] Abdul-Hamid, A. and Luan, Y. S. (2000). Functional properties of dietary fiber prepared from defatted rice bran. Food Chemistry, 68: 15–19.
- [23] Yasumatsu, K., Sawada, K., Moritaka, S., Misaki, M., Toda, J. and Wada, T. (1972). Whipping and emulsifying properties of soybean products. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 36: 719–727.
- [24] Chen, G., Zhang, S., Ran, C., Wang, L. and Kan, J. (2016). Extraction, characterization and antioxidant activity of water-soluble polysaccharides from *Tuber huidongense*. International Journal of Biological Macromolecules, 91: 431–442.
- [25] Jiang, C., Li, X., Jiao, Y., Jiang, D., Zhang, L. and Fan, B. (2014). Optimization for ultrasound-assisted extraction of polysaccharides with antioxidant activity *in vitro* from the aerial root of *Ficus microcarpa*. Carbohydrate Polymers, 110: 10–17.
- [26] Jeddou, K.B., Chaari, F., Maktouf, S., Nouri-Ellouz, O., Helbert, C.B. and Ellouz Ghorbel, R. (2016). Structural, functional, and antioxidant properties of water-soluble polysaccharides from potatoes peels. Food Chemistry, 205: 97–105.
- [9] Tadyoni, M., Sheikh Zynodin, M., Soleymannejad, S. (2015). Isolation of polysaccharides from date stone and evaluation of its some functional properties. Journal of Innovative Food Technologies 4: 49-60.
- [10] Ozturk, B. and Julian McClements, D. (2016). Progress in natural emulsifiers for utilization in food emulsions. Food Science, 7:1-6.
- [11] Mateos-Aparicio, I., Redondo-Cuenca, A., Villanueva-Suárez, M.-J., Zapata-Revilla, M.-A. and Tenorio-Sanz, M.-D. (2010). Pea pod, broad bean pod and okara, potential sources of functional compounds. Food Science and Technology, 43:1467-1470.
- [12] Jalili Safaryan, M., Ganjloo, A., Bimakr, M. and Zarringhalami, S. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction, preliminary characterization and *in vitro* antioxidant Activity of polysaccharides from green pea pods, Foods, 5: 78; doi: 10.3390/foods5040078.
- [13] Ghorbani, M., Ganjloo, A. and Bimakr, M. (2017). Evaluation the effect of different solvents on total phenolic content and antioxidant activity of pea (*Pisum sativum* L.) pod extract, Journal of Food Science and Technology, 64(14): 83-92 (In Persian).
- [14] Sevag, M.G., Lackman, D.B. and Smolens, J. (1938). The isolation of the components of streptococcal nucleoproteins in serologically active form. Journal of Biological Chemistry, 124:425-436.
- [15] Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical chemistry, 28: 350-356.
- [16] Zhang, Z., Lv, G., He, W., Shi, L., Pan, H. and Fan, L. (2013). Effects of extraction methods on the antioxidant activities of polysaccharides obtained from *Flammulina velutipes*. Carbohydrate Polymers, 98: 1524–1531.
- [17] Li, J.E., Nie, S.P., Xie, M.Y. and Li, C. (2014). Isolation and partial characterization of a neutral polysaccharide from *Mosla chinensis* Maxim. Cv. Jiangxiangru and its antioxidant and immunomodulatory activities. Journal of Functional Foods, 6: 410-418.

- [31] Kamarudin, F. and Gan, C.Y. (2016). Molecular structure, chemical properties and biological activities of pinto bean pod polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 88: 280–287.
- [32] Li, J-En., Wang, W-Jun., Zheng, G-Dong. and Li, L-Yan. (2017). Physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides from *Gynura procumbens* leaves by fractional precipitation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95: 719–724.
- [33] Mokni Ghribi, A., Sila, A., Maklouf Gafsi, I., Blecker, C., Danthine, S., Attia, H. and Besbes, S. (2015). Structural, functional, and ACE inhibitory properties of water soluble polysaccharides from chickpea flours. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75: 276–282.
- [34] Leroux, J., Langendorff, V., Schick, G., Vaishnav, V. and Mazoyer, J. (2003). Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloids*, 17: 455–462.
- [27] Yang L. and Zhang, L. (2009). Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohydrate Polymers*, 76(3):349-336.
- [28] Cai, W.R., Xie, L.L., Chen, Y. and Zhang, H. (2013). Purification, characterization and anticoagulant activity of the polysaccharides from green tea. *Carbohydrate Polymers*, 92: 1086–1090.
- [29] Chen, C., Zhanga, B., Huang, Q., Fu, X. and Liu R. H. (2017). Microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Moringaoleifera Lam.* leaves: Characterization and hypoglycemic activity. *Industrial Crops and Products*, 100: 1–11.
- [30] Ye, H., Zhou, C., Li, W., Hu, B., Wang, X. and Zeng, X. (2013). Structural elucidation of polysaccharide fractions from brown seaweed *Sargassum pallidum*. *Carbohydrate Polymers*, 97(2):659–664.

Evaluation of chemical characteristics, functional properties and anti-radical activity of water-soluble polysaccharides from green pea pod

Elham Lotfi¹, Ganjloo, A. ^{2*}, Mirkhalil Piroozifard³, Mandana Bimakr²

1. MSc, Department of Food and Science and Technology, University of Afagh, Urmia, Iran

2. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

3. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

(Received: 2017/02/11 Accepted: 2017/07/08)

The present study was aimed to evaluate chemical characteristics, functional properties and anti-radical activity of green pea pod polysaccharides as one of the abundant and low price by-product of food processing plants due to role of polysaccharides as biological macromolecules for free radicals scavenging. Green pea pod polysaccharides was extracted through steps including defatting, removing low molecular weight compounds, aqueous extraction, deproteinization, ethanol precipitation and washing with pure ethanol and acetone. Structural analysis was performed through fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy which characteristic bands of polysaccharides were observed in FTIR spectrum. The monosaccharide composition was found to be glucose, galactose, rhamnose, mannose, xylose and arabinose. Functional properties including water-holding and fat-binding capacities were 2.25 ± 0.12 g/g and 3.95 ± 0.98 g/g, respectively. Emulsion capacity and emulsion stability of green pea pod polysaccharides were more than 75% at a concentration of 6%. The anti-radical activity of green pea pod polysaccharides based on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and hydrogen peroxide (H₂O₂) assays was remarkable. Overall, the green pea pod can be introduce as a natural and low price resource for extraction of high value added products such as polysaccharides which can be used as novel natural anti-radical agent for functional food production besides its technological application.

Keywords: Hot water extraction, Polysaccharides, Green pea pod, Anti-radical activity.

* Corresponding Author E-Mail Address: aganjloo@znu.ac.ir